

文章编号: 1674-5566(2026)01-0001-12

DOI:10.12024/jsou.20241004656

## 凡纳滨对虾C型凝集素基因(*LvCTLE*)的克隆及其功能分析

张欢<sup>1,2,3,4</sup>, 王瑶华<sup>1,2,3,4</sup>, 闫茂仓<sup>1,2,3,4</sup>, 冀德伟<sup>1,2,3,4</sup>, 黄贤克<sup>1,2,3,4</sup>,  
罗奎<sup>1,2,3,4</sup>, 张敏<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江 温州 325000; 2. 全省近岸生物种质资源保护与利用重点实验室, 浙江 温州 325000; 3. 浙江-泰国海洋技术联合实验室, 浙江 温州 325000; 4. 温州市海洋生物遗传育种重点实验室, 浙江 温州 325000)

**摘要:** C型凝集素(C-type lectin, CTL)是识别碳水化合物结构域的重要模式识别受体。本研究基于转录组测序结果, 分离克隆了1个凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)C型凝集素, 命名为*LvCTLE*, 并对其表达和功能进行了分析。结果显示, *LvCTLE* cDNA全长为1 231 bp, 开放阅读框702 bp, 编码233个氨基酸。*LvCTLE*氨基酸序列N末端含有1个编码17个氨基酸的信号肽结构域, C末端含有1个编码134个氨基酸的糖识别结构域(CRD)。*LvCTLE*基因在所检测的9个组织中均有表达, 在肌肉和鳃组织中表达量较高。肌肉注射副溶血性弧菌后, *LvCTLE*基因在对虾肌肉和鳃组织的表达量均呈先上调后下降的趋势, 且在12 h表达量达到峰值。原核表达的重组蛋白r*LvCTLE*的凝菌活性具有Ca<sup>2+</sup>依赖性, 可以凝集格氏乳球菌、大肠杆菌、副溶血性弧菌和塔氏弧菌。r*LvCTLE*对大肠杆菌的凝集作用可以被D-葡萄糖、D-果糖、D-半乳糖和D-甘露糖抑制。综上所述, *LvCTLE*能够凝集副溶血弧菌, 而且其表达水平在弧菌攻毒条件下有所变化, 推测其参与了凡纳滨对虾对副溶血弧菌的响应过程。

**关键词:** 凡纳滨对虾; C型凝集素; 重组蛋白; 凝集活性

**中图分类号:** S 917.4 **文献标志码:** A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)又称南美白对虾, 是我国集约化养殖的优良品种<sup>[1-2]</sup>。随着其养殖规模的不断扩大, 病害、种质等问题纷至沓来, 常见的对虾传染性疾病包括急性肝胰腺坏死(Acute hepatopancreas necrosis disease, AHPND)<sup>[3]</sup>、肝肠胞虫(*Enterocytozoon hepatopenaei*, EHP)病<sup>[4]</sup>、白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)病<sup>[5]</sup>、十足目虹彩病毒1(Decapod iridescent virus 1, DIV1)病<sup>[6-7]</sup>等, 这些病害持续影响着对虾产业的可持续发展<sup>[8]</sup>。其中急性肝胰腺坏死病为中国三类动物疫病, 主要由副溶血性弧菌引起, 对虾感染后会出现肝胰腺萎缩、颜色泛白、空胃空肠、丧失活力等症状, 常为急性死亡, 死亡率高达100%<sup>[9]</sup>。因此, 深入研究对虾的免疫防御机制对其健康养殖具有重要

作用。

C型凝集素(C-type lectin, CTL)是甲壳动物最重要的模式识别受体之一, 在对虾免疫应答和病原清除过程中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。近年来, 关于甲壳动物C型凝集素的相关报道不断增加, C型凝集素的主要作用包括结合、凝集细菌<sup>[11-12]</sup>; 促进细胞黏附, 如克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)的PcLec3<sup>[13]</sup>; 细菌清除, 如中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)的EsCTLDcp<sup>[14]</sup>等。现已报道的凡纳滨对虾C型凝集素主要通过凝集、杀死或促进血淋巴中的细菌清除机制在抗菌、抗病毒免疫中发挥重要作用<sup>[15-20]</sup>。

本研究基于课题组前期的转录组分析结果, 分离克隆了1个凡纳滨对虾C型凝集素, 命名为*LvCTLE*。对其进行生物信息学和免疫应答特征

收稿日期: 2024-10-10 修回日期: 2025-08-25

基金项目: 浙江省农业(水产新品种选育)新品种选育重大科技专项(2021C02069-5); 浙江省重点研发计划(2021C02025)

作者简介: 张欢(1997—), 女, 助理工程师, 研究方向为对虾遗传育种。E-mail: zhangxihuan522@163.com

通信作者: 张敏, E-mail: milyzhang84@hotmail.com

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

分析后,纯化重组蛋白对其凝菌活性和糖结合特异性进行检测,研究结果有助于深入了解凡纳滨对虾抗细菌感染的免疫应答机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用凡纳滨对虾均来自浙江省海洋水产养殖研究所永兴基地。取样对虾质量 20.33~22.48 g,体长 18.21~20.60 cm。免疫刺激实验对虾质量 1.64~2.15 g,体长 3.51~4.60 cm,于持续充氧的配置海水内暂养。暂养海水盐度为 22,水温保持在 28 °C。暂养期间使用正大对虾配合饲料 1 号料喂养,每天投喂 3 次,每次投食量为对虾体质量的 1.5%。为保证水环境的整洁,每两天换 1 次水,换水量为总体积的 1/3。取样在冰浴条件下进行,取样后对虾收集在同一塑料袋内统一处理。

格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*, Y180707)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, DX160807)、鳃弧菌(*Vibrio*

*anguillarum*, Y210705)、塔氏弧菌(*Vibrio tubiashii*, DX170701)和酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)均为实验室保存菌株。

### 1.2 RNA 提取和 cDNA 合成

使用 EASYspin Plus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)提取各个组织 RNA。使用 Nano-400 超微量核酸分析仪(杭州奥盛仪器有限公司)检测 RNA 浓度,配合 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 是否降解,放于 -80 °C 保存备用。根据 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)说明书[宝日医生物技术(北京)有限公司],RNA 以 1 μg 总量先去除基因组 DNA,再反转录得到 cDNA。

### 1.3 引物设计与合成

在 NCBI 上预测 *LvCTLE* (GenBank: PP622763) 基因序列的编码区,在编码区内利用 Primer 5.0 软件设计全长序列克隆、荧光定量 PCR 以及构建重组表达载体的引物,引物序列详细信息见表 1。

表 1 试验所用引物  
Tab. 1 Primers used in the experiment

引物名称 Primer names	引物序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')
<i>LvCTLE</i> -F	TAGAATTCAGTGAGATCAGTTCCTCATAAG
<i>LvCTLE</i> -R	TCTATAAACATCCTCCGTCACATAGATTCA
<i>LvCTLE</i> -RTF	GAAGGAAGGCGAATGGAG
<i>LvCTLE</i> -RTR	TGGAGGGTGGCACAGTTA
<i>EF1α</i> -RTF	TATGCTCCTTTTGGACGTTTTGC
<i>EF1α</i> -RTR	CCTTTTCTGCGGCCTTGGTAG
<i>LvCTLE</i> pET30a-F	CCC <u>CATATG</u> CGTGTGGTAGTAGCAGTTCTT
<i>LvCTLE</i> pET30a-R	CCCTCGAGGCCCGTCTCGAAGGGGTGA

注:限制性内切酶的酶切位点用下划线标出,划线序列 CATATG 为 *Nde* I 的酶切识别位点,CTCGAG 为 *Xho* I 的酶切识别位点。

Notes: The restriction endonuclease restriction sites are underlined, the underlined sequence CATATG is the recognition site for *Nde* I, CTCGAG is the recognition site for *Xho* I.

### 1.4 *LvCTLE* 基因全长 cDNA 克隆

以凡纳滨对虾组织 cDNA 为模板,*LvCTLE*-F/R 为引物,利用 PrimeSTAR® Max DNA 酶进行 PCR 扩增。PCR 程序:94 °C 预变性 5 min;98 °C 变性 10 s,57 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;72 °C 总延伸 10 min。PCR 产物使用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,符合标准的条带使用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行纯化回收。胶回收产物与 pEASY-Blunt Zero 克隆载体连接,挑取阳性单

克隆菌株送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

### 1.5 *LvCTLE* 基因序列的生物信息学分析

测序结果使用 DNAMAN 软件进行整合拼接,获得 *LvCTLE* 基因全长序列。使用 NCBI 在线工具查找开放阅读框并预测其氨基酸序列;使用 ProRaram Tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测氨基酸序列的理化性质;使用 Signalp 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/>

services/SignalP-5.0/) 进行信号肽预测;使用DTU/DeepTMHMM BioLib 程序 (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>)预测蛋白质跨膜结构;采用 Expasy (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl>)在线分析蛋白的亲水性/疏水性;采用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测推导的基因蛋白质的结构域;使用 Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>)在线软件进行同源建模,预测蛋白质的三级结构;使用 DNAMAN 软件进行C型凝集素氨基酸序列多序列比对。使用MEGA 6.0软件采用Neighbour-Joining (NJ)方法构建系统发育树,引导重复数即Bootstrap设置为1 000,保证各分支的可信度。

### 1.6 *LvCTLE* 基因实时荧光定量PCR分析

在冰上进行活体解剖,抽取血淋巴液氮速冻后,取眼柄、鳃、心脏、肝胰腺、胃、肠、神经以及肌肉组织;使用PBS缓冲液漂洗,液氮速冻后于-80℃保存备用。采用1.2节中的试验方法获得cDNA模板,以*LvCTLE*-RTF/R为引物,利用荧光定量PCR的方法分析各组织中*LvCTLE*基因的表达情况。

采用肌肉注射方式进行副溶血性弧菌免疫刺激试验,菌液注射浓度为 $1 \times 10^7$  CFU/mL。在感染后的第0、3、6、12、24、48、72小时随机采集3尾凡纳滨对虾的鳃和肌肉组织,以*LvCTLE*-RTF/R为引物,利用荧光定量PCR分析*LvCTLE*基因的表达量变化。

荧光定量内参基因为*EF1 $\alpha$* ,扩增引物为*EF1 $\alpha$* -RTF和*EF1 $\alpha$* -RTR。荧光定量PCR程序:95℃预变性5 min,95℃变性5 s,56℃退火20 s,72℃延伸30 s,40个循环。试验设置3个生物学重复,3个技术重复。反应结束后导出试验结果,应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法<sup>[21]</sup>,使用SPSS软件进行显著性分析( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。

### 1.7 重组蛋白诱导纯化

#### 1.7.1 重组表达载体的构建

根据完整cDNA的开放阅读框和表达载体的多克隆位点序列设计含有酶切位点的特异性引物。使用含有内切酶上、下游引物扩增(表1),将PCR产物连接到pET30a载体,构建重组克隆载体pET30a-*LvCTLE*。使用限制性内切酶*Nde* I和*Xho* I对重组克隆载体进行双酶切,同时连接

转化到*E.coli* T1感受态细胞,挑取单克隆阳性菌落PCR验证,验证成功的重组克隆载体由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

#### 1.7.2 重组蛋白的诱导表达

将含有His标签的pET30a-*LvCTLE*转化至BL21(DE3)中。挑取单克隆阳性菌落220 r/min,37℃过夜培养,次日按1:100进行扩培,220 r/min,37℃培养4 h。当OD<sub>600</sub>值达到0.6~0.8时加入诱导剂异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(TPTG,终浓度0.2 mmol/L),37℃诱导培养4 h。离心诱导菌液,使用PBS缓冲液洗涤2~3次,在冰浴条件下进行超声破碎,4℃,8 000 r/min离心30 min分离上清与沉淀,使用12% SDS-PAGE电泳分析表达情况。

#### 1.7.3 重组蛋白纯化

使用Ni-IDA Binding-Buffer预平衡Ni-IDA-Sepharese Cl-6B亲和层析柱,上清样品使用0.45  $\mu$ m的滤膜过滤,利用低压层析系统,低速上样,流出液OD<sub>280</sub>值到达基线为止。使用Ni-IDA Washing-Buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 30 mmol/L 咪唑, 0.15 mol/L NaCl, pH 8.0)低速冲洗,清除非特异性吸附的杂蛋白,至流出液OD<sub>280</sub>值到达基线。最后使用Ni-IDA Elution-Buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 250 mmol/L 咪唑, 0.15 mol/L NaCl, pH 8.0)洗脱目的蛋白,收集洗脱液即为纯化蛋白液。纯化后使用0.5 mg/mL牛血清蛋白(BSA)为对照,通过12% SDS-PAGE电泳进行蛋白质分析和Western Blot鉴定分析。Western Blot步骤如下:SDS-PAGE电泳结束后,将凝胶放置转膜液里浸泡5~10 min,PVDF膜在甲醇中浸泡15 s,在200 mA,45 min条件下将蛋白转印至PVDF膜;PVDF膜用PBST (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20, pH=7.5)洗涤4次,每次5 min,然后置于37℃摇床封闭1 h;用PBST稀释一抗(鼠抗His抗体),4℃过夜孵育;次日结束后用PBST洗膜4次,每次5 min;用含有5%牛奶的封闭液1:1 000稀释二抗(羊抗鼠),37℃孵育1 h;反应结束后,使用PBST洗膜4次,每次5 min;最后使用ECL法进行显影,曝光。利用Bradford法,以0.5 mg/mL BSA为对照,将考马斯亮蓝G-250与蛋白混合,混匀后使用酶标仪测定595 nm处的吸光度,绘制标准曲线,推算所测蛋白浓度。



### 1.8 rLvCTLE1的细菌凝集活性分析

试验用菌过夜培养后使用TBS(50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 7.5)缓冲液漂洗2~3次,重悬后加入4',6-二脒基吡啶(DAPI,终浓度100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),暗处染色30 min。染色后使用TBS缓冲液洗去未结合的DAPI染液,分别使用TBS- $\text{CaCl}_2$ 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.5)和TBS-EDTA缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, pH 7.5)重悬菌体,使其浓度为 $2 \times 10^8$  CFU/mL。试验在96孔培养板中进行,蛋白梯度稀释,取10  $\mu\text{L}$ 菌悬液与20  $\mu\text{L}$ 溶于TBS缓冲液重组蛋白混匀。重组蛋白终浓度为20、50、75、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。37  $^\circ\text{C}$ 孵育1 h,在荧光显微镜下观察凝集情况。

### 1.9 rLvCTLE1的碳水化合物结合能力

为检测rLvCTLE的碳水化合物特异性结合能力,以大肠杆菌为试验菌,以D-葡萄糖、D-果糖、D-半乳糖、D-甘露糖、麦芽糖、蔗糖和海藻糖7种糖进行试验。将DAPI染色菌体使用TBS- $\text{CaCl}_2$ 缓冲液重悬,使菌液浓度为 $2 \times 10^8$  CFU/mL。取10  $\mu\text{L}$ 菌液、10  $\mu\text{L}$ 重组目的蛋白(终浓度200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和10  $\mu\text{L}$ 糖溶液在96孔板中混匀,37  $^\circ\text{C}$ 孵育1 h,取10  $\mu\text{L}$ 混合液在荧光显微镜下观察不同糖类的抑凝效果。受试糖终浓度为25、50、100、200、400 mmol/L。

## 2 结果

### 2.1 LvCTLE全长克隆及分析

本研究克隆获得了LvCTLE基因全长cDNA序列(GenBank: PP622763)。LvCTLE基因全长1 231 bp,包含5'端非编码区148 bp,3'端非编码区381 bp和1个702 bp的开放阅读框。开放阅读框编码233个氨基酸,预测蛋白质分子量为25.73 ku,理论等电点为4.96(图1a)。氨基酸结构预测显示,LvCTLE的N端含有1个编码17个氨基酸的信号肽结构域,C末端含有1个编码134个氨基酸的糖识别结构域(CRD)(图1b)。三级结构预测显示,与Phyre 2软件中已知蛋白的同源性较低,最后以与海藻糖结合的C型凝集素2分子为模板建模,序列相似度为28%,可信度高达99.9%(图

1c)。LvCTLE氨基酸序列在NCBI中BLASTP比对结果显示,LvCTLE与日本对虾(*Penaeus japonicus*, XP\_042859448.1)、中国对虾(*F. chinensis*, XP\_047484586.1)、印度对虾(*Penaeus indicus*, XP\_063598892.1)和斑节对虾(*Penaeus monodon*, XP\_037799151.1)序列的一致性较高,为70.82%~72.96%。

多序列比对结果显示,各序列间具有较高的相似性,LvCTLE具有4个高度保守的半胱氨酸残基以及典型的EPN基序(图2)。系统进化分析显示,LvCTLE与日本对虾、中国对虾、印度对虾、斑节对虾和凡纳滨对虾的C型凝集素在同一支(图3)。

### 2.2 LvCTLE组织表达及免疫应激响应

实时荧光定量PCR检测了LvCTLE基因在对虾不同组织中的表达水平,结果显示,LvCTLE在血淋巴、眼柄、鳃、心脏、肝胰腺、胃、肠、神经以及肌肉等9种组织中均有表达,其中肌肉和鳃中表达量最高,肠次之(图4a)。在副溶血性弧菌免疫刺激后,肌肉和鳃中LvCTLE的表达量均显著上调,呈先上升后下降的趋势,且在12 h时表达量达到了峰值(图4b、4c)。

### 2.3 重组蛋白rLvCTLE的诱导表达

重组蛋白rLvCTLE诱导表达后,12% SDS-PAGE电泳结果显示融合蛋白在25~35 ku处,与预期蛋白大小相符。并且在破碎上清中的表达量明显高于沉淀(图5a)。诱导菌液大量培养后使用Ni-IDA Resion法纯化所得蛋白液。纯化后使用0.5 mg/mL牛血清蛋白(BSA)为对照,通过12% SDS-PAGE电泳检测无杂带(图5b)。Western blot检测证实重组蛋白可以与抗体特异性结合(图5c)。利用Bradford法测定重组蛋白浓度为0.2 mg/mL。

### 2.4 重组蛋白rLvCTLE的凝菌活性检测

不同浓度rLvCTLE对细菌的凝集活性显示,在 $\text{Ca}^{2+}$ 存在的情况下,rLvCTLE可以凝集格氏乳球菌、大肠杆菌、副溶血性弧菌和塔氏弧菌,对鳗弧菌和酿酒酵母菌无凝集作用;而在不含有 $\text{Ca}^{2+}$ 的情况下,rLvCTLE对细菌没有凝集活性(图版I)。因此,rLvCTLE的凝菌活性具有 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖性。rLvCTLE对细菌的最小凝集浓度见表2。





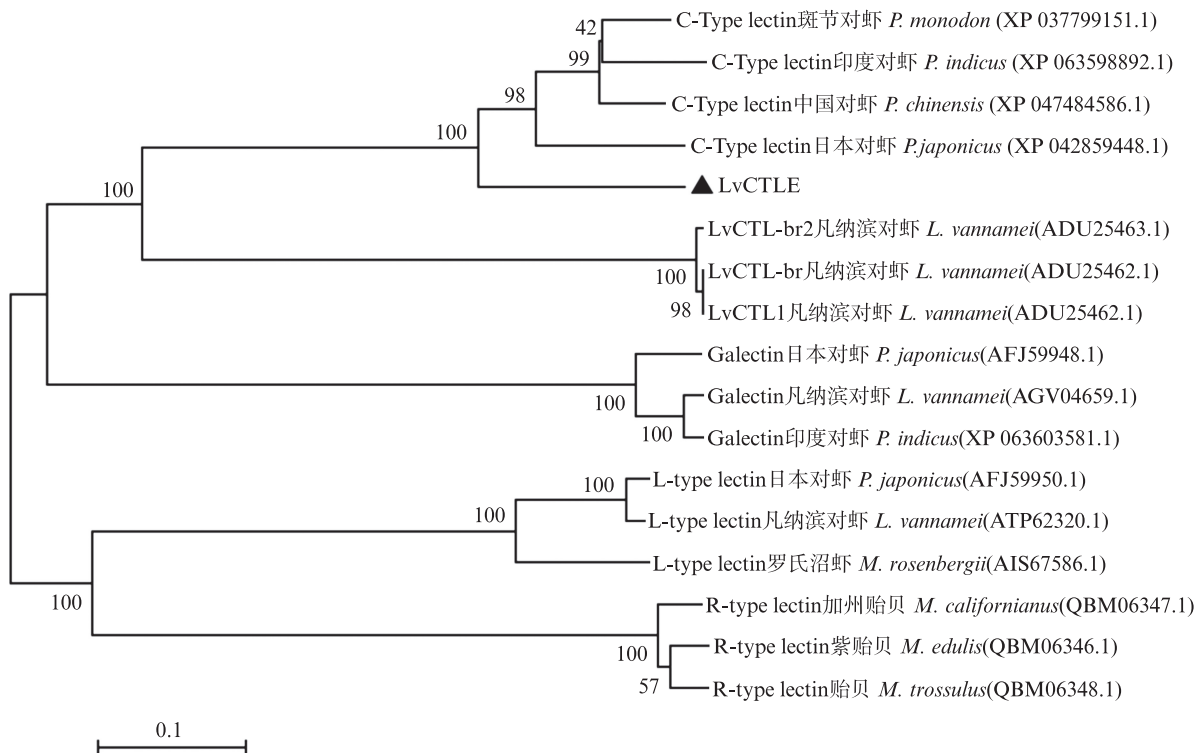
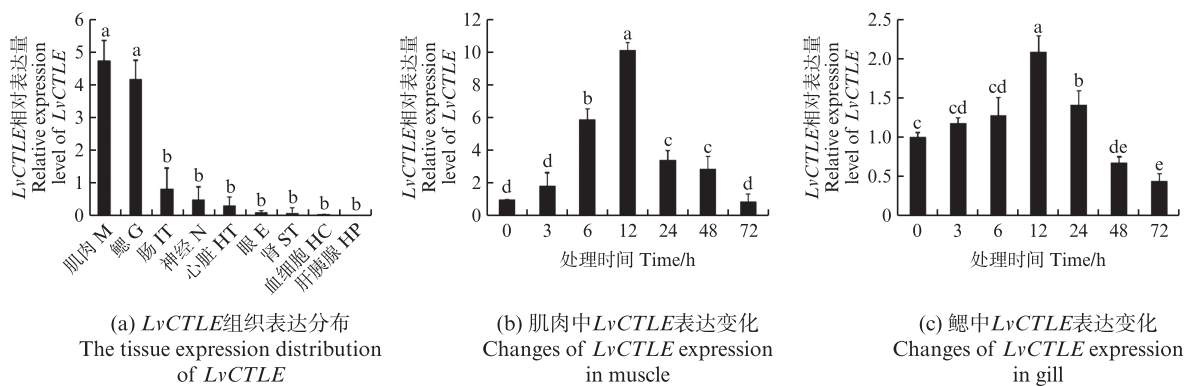


图3 使用NJ法构建的*LvCTLE*与其他物种凝集素的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *LvCTLE* and lectins from other species constructed using NJ method



图中字母不同代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Different letters indicate the mean values in the same figure are significantly different ( $P < 0.05$ ).

图4 *LvCTLE* 基因在凡纳滨对虾组织中的表达谱及副溶血性弧菌刺激下的免疫应激响应

Fig. 4 Expression profile of *LvCTLE* gene in tissues of *Litopenaeus vannamei* and immune stress response under *Vibrio parahaemolyticus* stimulation

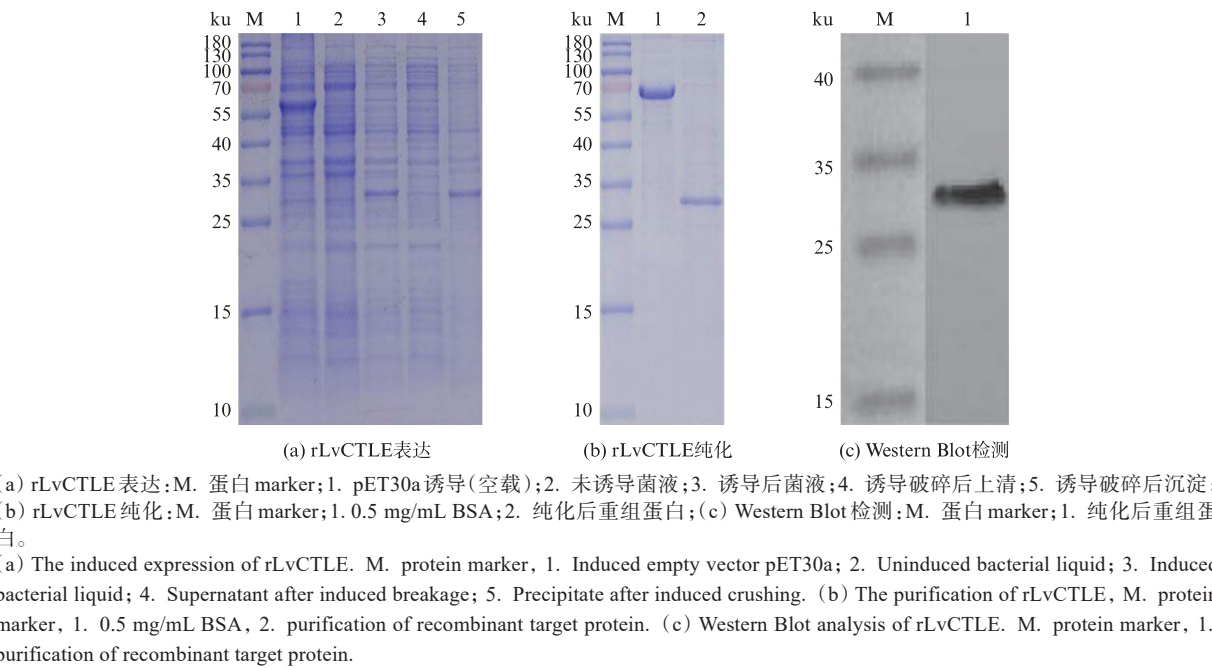


图 5 rLvCTLE 表达纯化和 Western Blot 检测

Fig. 5 The induced expression and purification of rLvCTLE, and Western Blot analysis of rLvCTLE

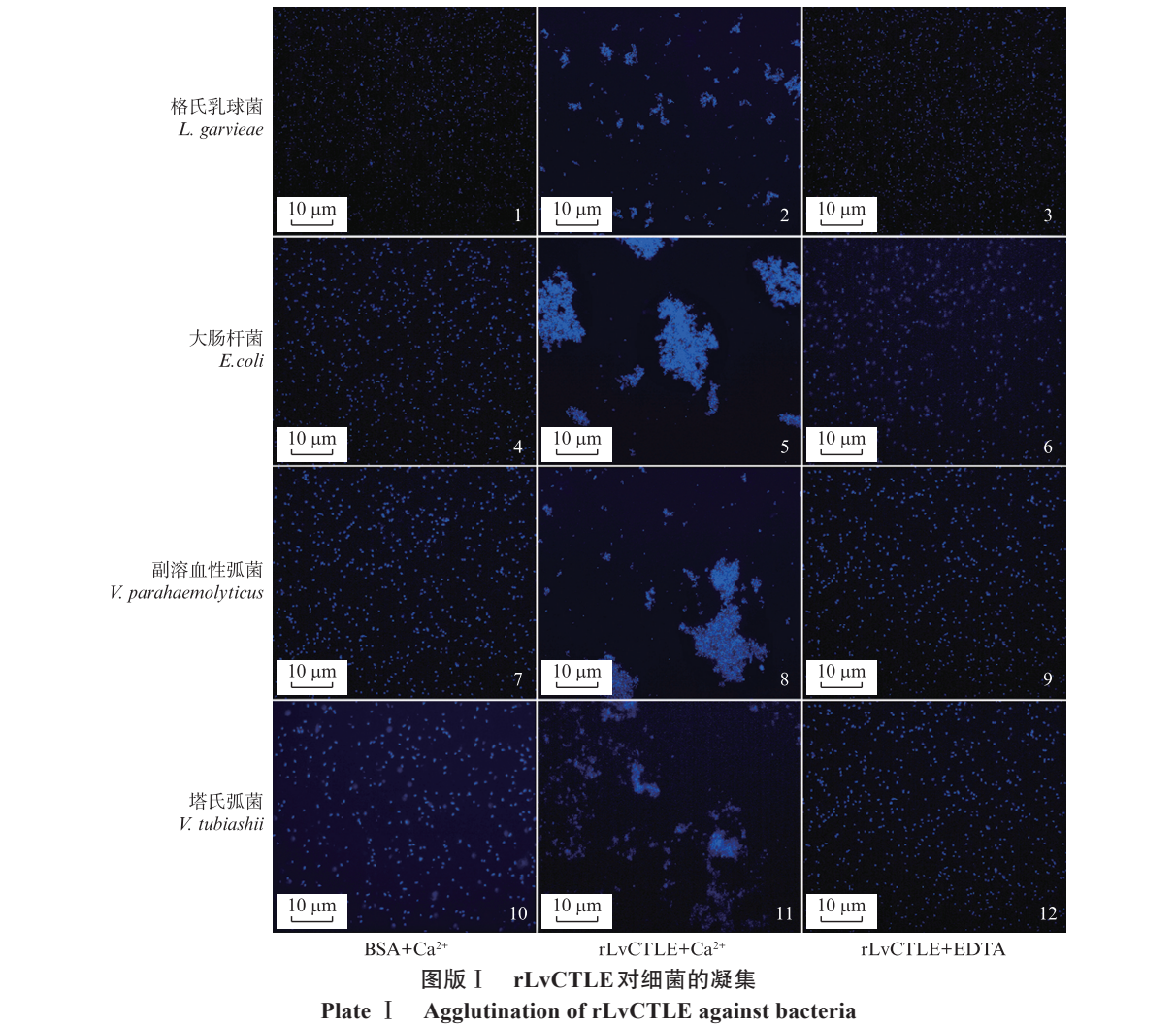




表2 rLvCTLE对细菌的最小凝集浓度  
Tab. 2 The minimal agglutinating concentration of rLvCTLE against bacteria

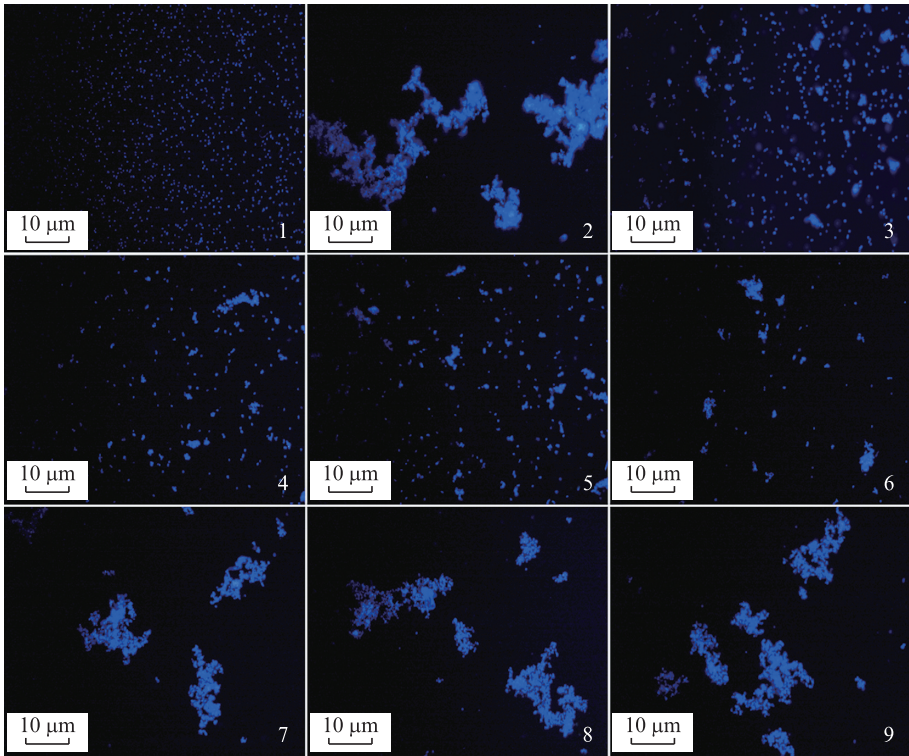
菌株 Bacteria	最小凝菌浓度 Minimal agglutinating concentration
	LvCTLE/(μg/mL)
革兰氏阳性菌(G+)	
格氏乳球菌 <i>L. garvieae</i>	200
革兰氏阴性菌(G-)	
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	20
副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	200
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	NA
塔氏弧菌 <i>V. tubiashii</i>	200
真菌 Fungi	
酿酒酵母菌 <i>S. cerevisiae</i>	NA

注:NA表示重组目的蛋白最大受试浓度200 μg/mL条件下试验用菌未发生凝集。  
Notes: NA represented no agglutination at 200 μg/mL of rLvCTLE.

2.5 rLvCTLE的糖结合试验

糖结合试验结果显示,rLvCTLE对大肠杆菌的凝集作用可以被D-葡萄糖、D-果糖、D-半乳糖

和D-甘露糖抑制,而麦芽糖、蔗糖和海藻糖无法抑制其凝集作用(图版II)。各种糖类对rLvCTLE凝菌作用的最小抑制浓度如表3所示。



1-2. BSA和rLvCTLE在Ca<sup>2+</sup>存在下对大肠杆菌的凝集作用;3-6. 100 mmol/L的D-葡萄糖、200 mmol/L的D-果糖、50 mmol/L的D-半乳糖和50 mmol/L的D-甘露糖的抑制作用;7-9. 400 mmol/L的麦芽糖、蔗糖和海藻糖的抑制作用。  
1-2. the agglutinating effects of BSA and rLvCTLE on *E. coli* in the presence of Ca<sup>2+</sup>; 3-6. the inhibitory effects of 100 mmol/L D-glucose, 200 mmol/L D-fructose, 50 mmol/L D-galactose, and 50 mmol/L D-mannose, respectively; 7-9. the inhibitory effects of 400 mmol/L maltose, sucrose, and thehalose inhibitory effect of maltose, sucrose and thehalose at 400 mmol/L.

图版II 糖类对rLvCTLE凝集大肠杆菌的抑制作用  
Plate II The inhibitory effect of carbohydrates on rLvCTLE agglutination of *Escherichia coli*

表3 糖类对rLvCTLE凝集大肠杆菌的最小抑制浓度  
Tab. 3 Minimal inhibition concentration of sugar on the agglutination of rLvCTLE toward *E. coli*

糖类 Sugar	最小抑制浓度 Minimal inhibition concentration
	<i>LvCTLE</i> /(mmol/L)
D-葡萄糖 D-glucose	100
D-果糖 D-fructose	200
D-半乳糖 D-galactose	50
D-甘露糖 D-mannose	50
麦芽糖 Maltose	NI
蔗糖 Sucrose	NI
海藻糖 Trehalose	NI

注:NI表示受试糖类最大浓度400 mmol/L条件下,对细菌凝集没有抑制作用。

Notes: NI represented no inhibition at 400 mmol/L.

### 3 讨论

C型凝集素是作为一种重要的PRR,在机体生长发育和免疫防御过程中发挥重要的作用。近年来,研究人员陆续从不同种类的甲壳动物中鉴定出C型凝集素,如日本沼虾<sup>[22]</sup>、三疣梭子蟹<sup>[23]</sup>、菲律宾蛤仔<sup>[24]</sup>等。本研究克隆得到1个凡纳滨对虾C型凝集素*LvCTLE*,预测的*LvCTLE*氨基酸序列无跨膜结构域,N端有信号肽,C端有C型凝集素特有的碳水化合物识别结构域,属于C型凝集素家族。因其含有信号肽,推测其以分泌蛋白的形式发挥作用<sup>[15]</sup>。多序列比对结果表明,*LvCTLE*氨基酸序列的CRD结构域包含4个保守的半胱氨酸残基,和1个典型的糖结合基序EPN,表明其具有碳水化合物亲和性<sup>[25]</sup>。系统进化分析结果显示,*LvCTLE*与C型凝集素聚为一大支,而未与已报道的凡纳滨对虾C型凝集素聚为一小簇,表明*LvCTLE*与已报道的凡纳滨对虾C型凝集素在氨基酸组成和潜在功能上可能存在较大的差异。综上所述,*LvCTLE*是1个新的C型凝集素,因其结构具有一定的保守性,推测其功能亦具有保守性。

已有报道显示,对虾C型凝集素主要在免疫器官和血细胞中表达,如斑节对虾的*PmLT*<sup>[26]</sup>、罗氏沼虾的*MrCTL*<sup>[27]</sup>以及凡纳滨对虾的*LvCTL1*和*LvLec2*主要在肝胰腺中表达<sup>[15]</sup>;中国对虾的*Flectin*只在血细胞中表达<sup>[28]</sup>;凡纳滨对虾的*LvCTL*免疫刺激后主要在鳃中表达<sup>[29]</sup>;而斑节对

虾的*PmAV*和凡纳滨对虾的*LvLectin1*和*LvLectin2*则在心脏和肌肉中表达<sup>[30-31]</sup>。本研究分析了*LvCTLE*在凡纳滨对虾9种组织中的表达情况,结果显示,该基因在所检测组织中均具有基础表达水平,在肌肉和鳃中表达量较高,肠次之。凡纳滨对虾的*LvLc2*在不同组织中均有表达,与本研究结果相似<sup>[32]</sup>。通常认为肝胰腺是对虾天然免疫防御机制中最重要的组织之一,鳃组织在呼吸、渗透调节和解毒中起着关键作用<sup>[33]</sup>;胃和肠道是对虾吸收营养和消化的重要器官,连通机体与外部环境,在识别和清除体外病原过程中发挥重要作用<sup>[34]</sup>。*LvCTLE*在不同组织都有表达,推测其在机体生长发育、免疫识别和防御过程中可能具有较为广泛的作用。*LvCTLE*的表达模式和*LvCTL1*、*LvCTL*的有所不同,说明不同的C型凝集素在对虾的不同部位发挥免疫防御作用。副溶血性弧菌注射感染凡纳滨对虾后,*LvCTLE*在肌肉和鳃组织中的表达量都显著上调,表明*LvCTLE*参与了凡纳滨对虾的生长调节和抗副溶血性弧菌感染的免疫防御过程。

凝集反应是抑制病原微生物入侵机体的重要途径之一,C型凝集素作为重要的模式识别受体,可以特异性结合病原菌表面受体,从而抑制病原微生物扩散<sup>[35]</sup>。迄今为止,许多甲壳动物的C型凝集素已被报道具有凝菌活性,且大部分C型凝集素的凝菌能力与Ca<sup>2+</sup>有关。如在Ca<sup>2+</sup>存在下,罗氏沼虾的MRCTL可以凝集革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)和革兰氏阴性菌(副溶血性弧菌)<sup>[36]</sup>;斑节对虾的*PmLec*重组蛋白可以凝集包括大肠杆菌、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)在内的革兰氏阴性菌和酵母<sup>[37]</sup>,rLvCTLU可以凝集无乳链球菌和副溶血性弧菌<sup>[38]</sup>。小部分凝菌活性与Ca<sup>2+</sup>无关,如凡纳滨对虾的rLvCTL7在无Ca<sup>2+</sup>存在条件下,可以凝集哈维氏弧菌和溶藻弧菌<sup>[39]</sup>;栉孔扇贝的rCflec在有和无Ca<sup>2+</sup>存在情况下都可以凝集毕赤酵母菌<sup>[40]</sup>。本研究中,表达并纯化了*LvCTLE*的重组蛋白,命名为rLvCTLE。细菌凝集试验结果显示,rLvCTLE对细菌的凝集属于Ca<sup>2+</sup>依赖型,可以凝集格氏乳球菌和三种革兰氏阴性菌(大肠杆菌、副溶血性弧菌、塔氏弧菌),对酿酒酵母菌无凝集效果,表明其可能主要在抵

御革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的免疫防御中发挥作用。糖抑制试验结果显示,rLvCTLE对多种单糖如D-葡萄糖、D-果糖、D-半乳糖、D-甘露糖具有较强的结合力,与麦芽糖、蔗糖和海藻糖无法结合,表明rLvCTLE可能是单糖的受体。

不同甲壳类动物C型凝集素在组织内表达不同,说明不同的C型凝集素在生物体生长发育过程中参与机体的免疫识别及防御作用不同。而凝集实验结果对于不同病原菌的凝集差异,则进一步验证C型凝集素种类不同,其氨基酸结构不同,功能会有所差异。比如部分凝集素对细菌有凝集作用,而凝集作用有无Ca<sup>2+</sup>依赖型是与Ca<sup>2+</sup>结合位点有关;部分凝集素只对病毒有清除作用等。糖抑制实验结果更是印证了结构对于凝集素功能的影响。因此,C型凝集素的结构差异以及在甲壳动物体内的免疫作用机制更有待进一步研究。

#### 4 结论

本研究从凡纳滨对虾肝胰腺中分离鉴定了1个新的C型凝集素LvCTLE,该基因在凡纳滨对虾所检测的各个组织中均有表达。对虾感染副溶血性弧菌后,肌肉和鳃中LvCTLE表达响应显著;重组目的蛋白rLvCTLE凝集活性具有Ca<sup>2+</sup>依赖性,可以凝集1种革兰氏阳性菌和3种革兰氏阴性菌。此外,其重组蛋白对细菌的凝集作用可以被多种单糖抑制,表明LvCTLE可能作为1种通过与病原菌表面糖类PAMPs结合的PRRs来进行非己识别,从而参与凡纳滨对虾抗弧菌感染的免疫防御。本研究分离获得的LvCTLE是1个新的C型凝集素,与已知的凡纳滨对虾C型凝集素结构和功能均有差异,研究结果不仅丰富了C型凝集素的种类,也丰富了C型凝集素相关的功能研究,为甲壳动物C型凝集素的研究奠定基础。

作者声明本文无利益冲突。

#### 参考文献:

- [1] 张伟权. 世界重要养殖品种——南美白对虾生物学简介[J]. 海洋科学, 1990(3): 69-72.  
ZHANG W Q. Important aquaculture species in the world-Introduction to the Biology of South American White Shrimp[J]. Marine Sciences, 1990(3): 69-72.
- [2] 王彩理, 毕国栋, 于爱美, 等. 凡纳滨对虾的营养功效和安全利用[J]. 农产品加工, 2021(24): 72-74.
- [3] WANG C L, BI G D, YU A M, et al. Nutritional effect and safe utilization of *Penaeus vannamei* [J]. Farm Products Processing, 2021(24): 72-74.
- [4] DABU I M, LIM J J, ARABIT P M T, et al. The first record of acute hepatopancreatic necrosis disease in the Philippines [J]. Aquaculture Research, 2017, 48 (3): 792-799.
- [5] JAROENLAK P, SANGUANRUT P, WILLIAMS B A P, et al. A nested PCR assay to avoid false positive detection of the microsporidian *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) in environmental samples in shrimp farms[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166320.
- [6] SÁNCHEZ-PAZ A. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern [J]. Veterinary Research, 2010, 41(6): 43.
- [7] LIAO X Z, HE J G, LI C Z. Decapod iridescent virus 1: An emerging viral pathogen in aquaculture[J]. Reviews in Aquaculture, 2022, 14(4): 1779-1789.
- [8] 王雯琼, 葛明峰, 卢先东, 等. 虾类十足目虹彩病毒1 (DIV1) LAMP-HNB快检方法的建立[J]. 安徽农业科学, 2024, 52(15): 192-196.
- [9] WANG W Q, GE M F, LU X D, et al. Establishment of LAMP-HNB Rapid Detection Method for Decapod Iridescent Virus 1 (DIV1) of shrimp[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2024, 52(15): 192-196.
- [10] FLEGEL T W. A future vision for disease control in shrimp aquaculture[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2019, 50(2): 249-266.
- [11] 林楠. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病原分离鉴定及耐药性分析[J]. 渔业研究, 2020, 42(6): 598-607.
- [12] LIN N. Isolation, identification and drug resistance analysis of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreas necrosis disease from *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fisheries Research, 2020, 42 (6): 598-607.
- [13] MAYER S, RAULF M K, LEPENIES B. C-type lectins: their network and roles in pathogen recognition and immunity [J]. Histochemistry and Cell Biology, 2017, 147(2): 223-237.
- [14] LAI X F, KONG J, WANG Q Y, et al. Identification and molecular characterization of a C-type lectin-like protein from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) [J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(3): 2223-2230.
- [15] HUANG Y, ZHANG R D, GAO T H, et al. 2-Transmembrane C-type lectin from oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* participates in antibacterial immune response [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 91: 58-67.
- [16] ZHANG X W, WANG Y, WANG X W, et al. A C-type lectin with an immunoglobulin-like domain promotes



- phagocytosis of hemocytes in crayfish *Procambarus clarkii* [J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 29924.
- [14] HUANG Y, AN L, HUI K M, et al. An LDLa domain-containing C-type lectin is involved in the innate immunity of *Eriocheir sinensis* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 42(2): 333-344.
- [15] ZHAO Z Y, YIN X X, XU X P, et al. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity [J]. Journal of Virology, 2009, 83(1): 347-356.
- [16] JUNKUNLOK, PRACHUMWATA, TANGPRASITTIPAP A, et al. A novel lectin domain-containing protein (LvCTL4) associated with response of the whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* to yellow head virus (YHV) [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2012, 37(3/4): 334-341.
- [17] ZHANG X, PAN L Q, YU J H, et al. One recombinant C-type lectin (LvLec) from white shrimp *Litopenaeus vannamei* affected the haemocyte immune response in vitro [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 89: 35-42.
- [18] SUO Y T, LI E C, LI T Y, et al. Response of gut health and microbiota to sulfide exposure in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 63: 87-96.
- [19] LI M, LI C Z, MA C X, et al. Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 46(2): 231-240.
- [20] LI H Y, CHEN Y G, LI M, et al. A C-type lectin (LvCTL4) from *Litopenaeus vannamei* is a downstream molecule of the NF- $\kappa$ B signaling pathway and participates in antibacterial immune response [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 43(1): 257-263.
- [21] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] 孙盛明, 傅洪拓, 宣富君, 等. 日本沼虾C型凝集素结构域家族3的cDNA克隆、原核表达和定位分析[J]. 水产学报, 2019, 43(11): 2317-2326.
- SUN S M, FU H T, XUAN F J, et al. Molecular cloning, prokaryotic expression and localization analysis of C-type lectin 3 (MnLec3) cDNA from *Macrobrachium nipponense* [J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(11): 2317-2326.
- [23] 黄萌萌, 雷宇桐, 王高杨, 等. 三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 含新型关键识别基序 DPY/WD 单结构域C型凝集素PcCTL-6的免疫功能研究[J]. 海洋与湖沼, 2019, 50(6): 1302-1308.
- HUANG M M, LEI Y T, WANG G Y, et al. Characterization of single CRD containing C-type lectin with novel motif DPY/WD from *Portunus trituberculatus* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2019, 50(6): 1302-1308.
- [24] LIU X L, YE S C, CHENG C Y, et al. Identification and characterization of a symbiotic agglutination-related C-type lectin from the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 92: 1-10.
- [25] DAMBUZA I M, BROWN G D. C-type lectins in immunity: recent developments [J]. Current Opinion in Immunology, 2015, 32: 21-27.
- [26] 秦玉凯. 两种斑节对虾C型凝集素抗菌功能研究及耐低盐、耐氨氮等相关表达模式分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- QIN Y K. Two kinds of C-type lectins response to bacterial infection and ammonia nitrogen, salinity stress in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019.
- [27] BALIARSINGH S, SAHOO S, JO Y H, et al. Molecular cloning, sequence characterization, and expression analysis of C-type lectin (CTL) and ER-Golgi intermediate compartment 53-kDa protein (ERGIC-53) homologs from the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Aquaculture International, 2022, 30(2): 1011-1035.
- [28] LIU Y C, LI F H, DONG B, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. Molecular Immunology, 2007, 44(4): 598-607.
- [29] COSTA F H F, VALENÇA N S M S, SILVA A R B P, et al. Cloning and molecular modeling of *Litopenaeus vannamei* (Penaeidae) C-type lectin homologs with mutated mannose binding domain-2 [J]. Genetics and Molecular Research, 2011, 10(2): 650-664.
- [30] LUO T, ZHANG X B, SHAO Z Z, et al. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon* [J]. FEBS Letters, 2003, 551(1/3): 53-57.
- [31] WEI X M, LIU X Q, YANG J M, et al. Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(1): 132-140.
- [32] 郝少彦, 尹丝雨, 龚晨, 等. 一种凡纳滨对虾新的C型凝集素基因(LvLc2)的克隆及免疫应答特征[J]. 水产学报, 2021, 45(6): 948-957.
- HAO S Y, YIN S Y, GONG C, et al. Molecular cloning and characterization in immune response of a novel C-type lectin gene (LvLc2) from *Litopenaeus vannamei* [J]. Journal of Fisheries of China, 2021, 45(6): 948-957.
- [33] ALENTON R R R, KOIWA K, MIYAGUCHI K, et al.

- Pathogen recognition of a novel C-type lectin from *Marsupenaeus japonicus* reveals the divergent sugar-binding specificity of QAP motif[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 45818.
- [34] LI Z P, LI F, HAN Y L, et al. VP24 is a chitin-binding protein involved in white spot syndrome virus infection [J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(2): 842-850.
- [35] WANG X W, WANG J X. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 39(1/2): 27-38.
- [36] HUANG X, HUANG Y, SHI Y R, et al. Function of a novel C-type lectin with two CRD domains from *Macrobrachium rosenbergii* in innate immunity [J]. *Developmental & comparative immunology*, 2015, 49(1): 121-126.
- [37] LUO T, YANG H J, LI F, et al. Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2006, 30(7): 607-617.
- [38] SONG F, CHEN G L, LU K C, et al. Identification and functional characterization of a C-type lectin gene from *Litopenaeus vannamei* that is associated with ER-stress response [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 93: 977-985.
- [39] LUO J L, CHEN Y H, HUANG Y X, et al. A novel C-type lectin for *Litopenaeus vannamei* involved in the innate immune response against *Vibrio* infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 135: 108621.
- [40] ZHANG H, KONG P F, WANG L L, et al. Cflec-5, a pattern recognition receptor in scallop *Chlamys farreri* agglutinating yeast *Pichia pastoris* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 29(1): 149-156.

## Isolation and functional analysis of a C-type lectin gene (*LvCTLE*) in *Litopenaeus vannamei*

ZHANG Huan<sup>1,2,3,4</sup>, WANG Yaohua<sup>1,2,3,4</sup>, YAN Maocang<sup>1,2,3,4</sup>, JI Dewei<sup>1,2,3,4</sup>, HUANG Xianke<sup>1,2,3,4</sup>, LUO Kui<sup>1,2,3,4</sup>, ZHANG Min<sup>1,2,3,4</sup>

(1. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou 325000, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Key Laboratory of Coastal Biological Germplasm Resources Conservation and Utilization, Wenzhou 325000, Zhejiang, China; 3. Sino-Thai Joint Laboratory of Marine Science and Technology, Wenzhou 325000, Zhejiang, China; 4. Wenzhou Key Laboratory of Marine Biological Genetics and Breeding, Wenzhou 325000, Zhejiang, China)

**Abstract:** C-type lectin (CTL) is an important pattern recognition receptor for recognizing carbohydrate structural domains. In this study we isolated and cloned a *Litopenaeus vannamei* C-type lectin, named *LvCTLE*, and analyzed its expression and function. The results of the study show that the full-length sequence of the *LvCTLE* gene cDNA was 1 231 bp with an open reading frame of 702 bp, encoding 233 amino acids. The *LvCTLE* amino acid sequence contained a signal peptide structure encoding 17 aa at the N-terminus and a sugar recognition structural domain encoding 134 aa at the C-terminus. The results showed that *LvCTLE* was distributed in the 9 tissues tested, with higher expression in muscle and gill tissues. After intramuscular injection of *Vibrio parahaemolyticus*, the expression of *LvCTLE* gene in both muscle and gill tissues of shrimp showed a tendency of up-regulation followed by a decrease, and the expression reached a peak at 12 h. Prokaryotically expressed recombinant rLvCTLE had Ca<sup>2+</sup>-dependent agglutination activity and could agglutinate *Lactococcus garvieae*, *Escherichia coli*, *V. parahaemolyticus* and *V. tubiashii*. D-glucose, D-galactose, D-mannose, D-fructose, maltose, sucrose and alginose all had inhibitory effects on the agglutination of rLvCTLE toward *E. coli*. These results suggested that *LvCTLE* could be involved in the immune response against bacterial challenge in the innate immune system of *L. vannamei*.

**Key words:** *Litopenaeus vannamei*; C-type lectin; recombinant protein; bacterial agglutination